AN 113:38931 CA

TI Recombinant manufacture of transglutaminase of Caviidae liver (MTGase) with Escherichia

IN Ikura, Koji; Sasaki, Ryuzo; Chiba, Hideo

PA Ajinomoto Co., Inc., Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 8 pp.

CODEN: JKXXAF

DT Patent

LA Japanese

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
ΡI	JP 01300889	A2	19891205	JP 1988-132000	19880530 <
PRA	AT JP 1988-132000		19880530		

AB A method for manufacturing MTGase by cultivating recombinant E. coli is described. CDNA for MTGase was cloned from a guinea pig liver cDNA library and subsequently used to construct an expression plasmid pKTG1. The E. coli transformants were cultured and induced to produce MTGase determined by Western blotting. Purification of the recombinant MTGase with monoclonal antibody to MTGase by affinity chromatog. was given. The purified MTGase had a sp. activity of 1690 unit/mg + 104.

⑫ 公 開 特 許 公 報 (A) 平1-300889

50 Int. Cl. 4

@発 明

者

識別記号

庁内整理番号

❸公開 平成1年(1989)12月5日

C 12 N // C 12 N 15/00 G-8515-4B A-8717-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

69発明の名称 形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

英 雄

願 昭63-132000 ②)特

22出 願 昭63(1988)5月30日

特許法第30条第1項適用 昭和63年4月2日 社団法人日本農芸化学会開催の「昭和63年度日本農芸 化学会大会」において文書をもつて発表

70発 明 伊食 宏 司

京都府八幡市八幡山田26-1

@発 明 老 佐々木 隆 造 京都府京都市左京区田中東高原町14 京都府宇治市広野町新成田100-131

千 葉 ⑪出 願人 味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目5番8号

阴 細

1. 発明の名称

形質転換体及びこれを用いるHTGaseの製造 法

- 2. 特許請求の範囲
- (1) モルモット肝トランスグルタミナーゼ (以 下MTCaseと略す)をコードする遺伝子を含有する プラスミドにより形質転換された微生物。
- (1)記載の微生物。
- (3) 請求項(1)又は(2)項記載の微生物を培地中で 培養して目的とするリコンピナントMTGaseを生産 させ、該リコンピナントMTGaseを培地中から採取 することを特徴とするリコンビナントMTGaseの製 造法。
- 3. 発明の詳細な説明
- <産業上の利用分野>

本発明はMTGaseをコードする遺伝子を含有する プラスミドにより形質転換された微生物及び該微 生物によるリコンピナントMTGaseの製造法に関す

る。

< 従来技術 >

モルモット肝トランスグルタミナーゼ(Protein - glutamine: amine r - glutamyltransferase, EC2.3.2.13、以下TGase と略する) はタンパク質 の修飾酵素の一つであり、Ca²・依存性のアシル転 移酵素である。基質としては、アシル供与体とし てペプチド鎖中 GIn残基の r - カルボキシアミド 基が、アシル受容体としてアミン化合物の第1級 アミノ基やペプチド鎖中 Lvs残基のεーアミノ基 がそれぞれ反応する。

尚、反応機構は以下のとおりである。

$$\begin{array}{c}
0 \\
(CH_2)_2 - C - NH_2 + NH_2 - (CH_2)_4 + 2 \\
\frac{1}{61n}
\end{array}$$

$$+ NH_2 - R$$

$$+ NH_3 - R$$

酵素の給源としてモルモットの肝臓のTGase (以下MTGaseと略する) が用いられている。

的機構

しかしながら、MTGaseは質的には良好であるが、モルモット肝臓が供給源であることより取得できる量が限られていること、及び精製法が非常に複雑で収率が極めて悪いこと、更にはモルモット自体が非常に高価であることなどの欠点がある。従って、以前よりMTGaseを大量に、しかも安価に更には簡便に生産する方法の提供が望まれていた。

本解明が解決しようとする課題は、遺伝子工学的手法を用いて、微生物から大量に目的とするリコンピナントMTGaseを生産する方法の提供にある。
<本発明の課題を解決する為の手段 >

本発明者等は上記課題を解決すべく鋭意研究を 行った結果、MTGaseをコードする遺伝子を含有す るプラスミドにより形質転換された微生物を培養 することにより、目的とするリコンピナントMTGase を多量に生産せしめることができ、本発明を完成 に至らしめた。 即ち、この酵素が触媒する反応としては、ペプチド鎖中 GIn残基とペプチド鎖中 Lys残基との間でのモー(エーグルタミル)リジン架橋結合の形成、ペプチド鎖中 GIn残基へのアミン化合物の導入、あるいはアミン化合物非存在下でのペプチド鎖中 GIn残基の脱アミド反応である。

このTGase は多くの動物の様々な部位で見つけられているが、この生理機能として知られているものはほとんどがタンパク質間架橋形成反であり、血液凝固カスケード反応の最終ステップであるフィブリンモノマーの架構重合による安定化、表皮組織の角質層における不溶性タンパク質の形成、毛タンパクの架橋形成、などである。

TGase を利用すれば、蛋白質の生化学的研究、新しい酸素反応系の形成や、再利用可能な補酵素 誘導体ーカゼイン複合体の形成、さらには必須アミノ酸を導入することによって食品蛋白質の栄養 価を改善することができ、従って大量入手する方法の開発が望まれている。

さて、現在TGase を利用するにあたって良質な

即ち、本発明は、MTGaseをコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物によるリコンピナントMTGaseの製造法である。

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明者等は既にMTGaseの部分重複cDNAクローンを複数個取得しており(第1図数)、これからMTGaseをコードするDNA 配列及びMTGaseのアミノ酸配列を決定している(Agric、Biol、Chem.51(3)、957-961 頁(1987年))これによると、MTGaseをコードするDNA は、開始コドン(ATG) と690残基のアミノ酸からなるコドンを含むものである(第2図数)。また本解素の分子量は76.620と算定されている。さて、MTGaseを生産する微生物の調製であるが、まず、MTGaseをコードする遺伝子を微生物内で複製可能なプラスミドに組み込む。この時、MTGaseをコードする遺伝子を発現ベクターのプロモーター配列下流に挿入すればよい。

組み込む方法は、プラスミドを適当な制限酵素で切断し、その切断部位に目的とするMTGaseをコ

ードする遺伝子を挿入し、接続すればよい。このようにして得られた組み換えDNA を原核生物宿主に導入し、得られた形質転換微生物の中からMTGaseを生産する株を選べば良い。本発明において、組み換えDNA が導入される微生物宿主としてはエシェリヒア・コリ、バチルス・ズブチリス等を用いることができるが、好ましくはエシェリヒア・コリを用いるのが良い。

また、本発明に用いることができるエシェリヒア・コリ用ベクターとしてはEKタイププラスミドベクター(リラックス型)、EKタイププラスミドベクター(ストリンジェント型)、 Agtタイプファージベクター等々の種々のベクターを用いることができる。

またプロモーターとしては trpプロモーター、
lac プロモーターを初めとするエシェリヒア・コ
リ中で機能するすべてのプロモーターが利用可能
である。

組み換えDNA を用いた宿主細胞の形質転換には、通常よく用いられる次の方法がある。エシェリヒ

培養菌体より、リコンピナントMTGaseを採取するには、通常以下のような方法で行えば良い。

即ち、培養閣体を冷却遠心機等で集菌した後、適当なパッファーに懸濁し、超音波あるいはダイノミルなどで関体を破砕して抽出液を得る。この 菌体抽出液を硫安沈澱分画法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル沪過法、抗体カラム法などを行ってリコンピナントMtGaseの精製標品が得られるわけである。

(効 果)

本発明はモルモットの肝臓が供給源である為に ①少量しかMTGaseを提供できない、②高価である、 ③精製操作が非常に煩雑である等の従来法の欠点 を解消し得る画期的な方法である。換言すれば、 本発明の方法を用いると、大量に、しかも、安く、 更に、簡便にMTGaseを提供し得るのである。

このようにして得られたリコンピナントMTGase は従来の天然型MTGaseと同様に、各種アミノ酸を 食品蛋白質に共有結合的に導入することにより、 栄養価や物性を改変することができる。また、本 ア・コリの如き原核生物が宿主の場合、このDNAを取り込むことの出来るコンピテント細胞は対数増殖期における細胞を回収後、良く知られているCaC & こ 法によって形質転換できる。形質転換反応液中に MgC & こ 又は RbC & を共存させれば形質転換効率は向上する。また宿主細胞のプロトプラスト調製後形質転換させることも可能である。

形質転換された微生物を培養する培地および培養方法は通常の培地、方法でよい。すなわち培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要に応じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。

炭素源としてはグルコース、シュクロース等及 びこれらを含有する澱粉加水分解物、糖密等が用 いられる。窒素源としてアンモニアガス、アンモ ニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。 より好ましくはペプトン、トリプトン、肉エキス、 酵母エキス等の天然素材なども使われる。

培養は好気的条件下で培地のpll及び温度を適宜 調節しつつ行なえば良い。

酵素は食品以外の医薬品、化成品への応用も期待 できる。

以下、本発明を実施例に従って説明する。 (実施例1:発現プラスミドpkTG1の構築)

本発明者等は既にMTGaseの部分重複cDNAのクローン5個を取得しており(第1図参)、またこれを基にDNA配列及びアミノ酸配列を決定している(第2図参)。

さて、まず第1図に示したプラスミドpLTG 1 6を含有するエシェリヒア・コリMC1061(以下、E. coli MC1061とする)及びプラスミドpLTG 2 1を含有するE.coli MC1061より以下の方法に従ってプラスミドpLTG 1 6及びプラスミドpLTG 2 1を抽出した。

即ち、培養液 1 0 0 m & を遠心分離により菌体のみ集め、5 0 mMTris - HC & , pH 7.5 の 5 m & に 想演し - 8 0 でに凍結後、融解して次にリゾチーム (最終濃度、2 mg/m &) を加えて 0 でで 1 0 分間静置し、さらにEDTA (最終濃度 0.1 M) を加え、0 でで 1 0 分間静置する。その後、Triton X

-100 (最終濃度 0.1%) を加えて 0 ℃で 6 0 分間静置する。ついで 30,000 rpm 、 3 0 分間違心分離し、その上清液を等量の水飽和フェノールで処理する。その水層をさらに等量のクロロホルムで処理し、その水層を抽出し、これに最終濃度 2 0 μg/mg となるように RNase を加え、 3 7 ℃で 6 0 分間インキュベートした。

その後0.2 容の5 M NaC & と 1/3 容のポリエチレングリコールを加え、0 ℃に60分間節置後、10.000rpm 20分間、遠心分離によりDNA 沈殿を回収する。

次にこの沈殿を 3.8 m e の水に溶解し、 4 g の CsC e を加えて溶解後、 1 0 mg/m e の EtBr の 200 μ e を加えて40.000 rpm 、 1 6 時間、 2 0 ℃で超速心分画を行う。

遠心終了後、プラスミド DNA 画分を抽出し、水飽和 n-7 タノールの $1\sim2$ 容で 4 回抽出操作を行って E t E

1621Aを調製した。

ii) <u>プラスミド pLTG 1621 B の構築</u>

- (イ)上記i)で得たプラスミドpLTG1621Aを制限酵素 Sal!及びHind IIで切断し、アガロース電気泳動分画により小さいDNA断片(約1440bp)を回収した。
- (ロ) プラスミドpLTG 2 1 を制限酵素Hind III 及び EcoRI で切断し、アガロース電気泳動分画に より、小さいDNA 断片(約7 4 0 bp)を回収 した。
- (ハ) プラスミド pUC 9 (ファルマシア社製) を 制限酵素 Sall及びEcoRI で切断し、アガロ ース電気泳動分画により、大きなDNA 断片を 回収した。
- (二)上記(イ), (ロ), (ハ)で得たDNA 斯 片をDNA リガーゼで連結させて、プラスミド pLTG1621Bを構築した。

iii) プラスミドpUTG 1 の構築

(イ) 上記 ii) で得たプラスミドpLTG1621 B を制限酵素 Nco I 及びBstE II で切断し、アガロー

-20 でで一晩静置する。このエタノール沈殿を遠心分離で集めて 80 %エタノール水溶液で洗浄後、よく乾燥し、この沈殿物を 50 μ ℓ の 1 m M EDTA を含む 10 m M Tris - HC ℓ , pH 7.5 に溶解しサンプルとした。

プラスミドpLTG 1 6 及びプラスミドpLTG 2 1 よりMTGase発現プラスミドpKTG 1 を構築した(第 3 及び 4 図)。以下に、その詳細を示した。

i) プラスミド pLTG 1621 A の構築

- (イ) さて、プラスミドpLTG 1 6 を制限酵素Bsm I、Hind II で切断し、アガロースゲル電気泳動分画により大きい方のDNA 断片を回収した。尚第3図及び第4図において制限酵素で切断したDNA 断片の内、使用したDNA 断片は破線で示した。
- (ロ) プラスミドpLTG 2 1 を制限酵素 Bsm!及び Hind ■で切断し、アガロースケル電気泳動分 画により、約7 4 0 bpのDNA 断片を回収した。
- (ハ) 上記(イ)及び(ロ)で得たDNA断片をDNA リガーゼを用いて連結させ、プラスミドpLTG

ス電気泳動分画により約370bpのDNA 断片を回収した。

- (ロ)上記ii)で得たプラスミドpLTG1621Bを制限酵素BstEI及び Sailで切断し、アガロース電気泳動分画により小さい方のDNA断片(約1700bp)を回収した。
- (ハ) プラスミド pUC 118N (京大、ウィルス研 牧先生より分譲された) を制限酵素、Nco I 及び Sal I で切断し、アガロース電気泳動分 画により、大きい方のDNA 断片を回収した。
- (二) 前記(イ)、(ロ)、(ハ)で得たDNA断 片をDNAリガーゼにより連結させてプラスミ ドpUTG1を構築した。

iv)<u>プラスミドpKTG1の構築</u>

- (イ)上記 iii)で得たプラスミドpUTG 1 を制限酵素 Nco 1 及びBstB I で切断し、アガロース電気泳動分画により約370 bpのDNA 断片を回収した。
- (ロ)上記iii) で得たプラスミドpUTG 1 を制限酵 素BstE I 及び Pst 1 で切断し、アガロース電

気泳動分画により小さい方のDNA断片(約1700 bp) を回収した。

- (ハ) trc プロモーター (trpプロモーター及び lac プロモーターの融合したもの)及びアンピシリン抵抗性を有するプラスミドpKK233ー2(ファルマシア社製)を制限酵素 Nco 「及び Pst I で切断し、アガロース電気泳動分画により、大きな DNA断片を回収した。
- (ニ)上記(イ)、(ロ)、(ハ)で得たDNA 断 片をDNA リガーゼを用いて連結させてMTGase 発現プラスミドpKTG 1 を構築した。

即ち、以上の操作を処することにより、2種類の 重複するcDNAを有するプラスミドpLTG 1 6 及び pLTG 2 1 からMTGaseをコードする全DNA 配列 (開 始コドンATG から終止コドンTAA まで)を含有す るプラスミドpKTG 1 を構築したわけである。

(実施例 2 大腸菌によるリコンピナントMTGase の生産)

i) 実施例1で作成した

プラスミドpKTG1を保持するエシェリヒア・コ

果は第5図に示した。

これからも分るようにプラスミドpKTG I を含有するエシェリヒア・コリJM103株(PERM P-10008)は関体内にリコンピナントMTGaseを生産していた。

ii)上記i)により関体内にMTGase蛋白が生産されていることを確認したので、このリコンピナントMTGaseを以下の方法で菌体より抽出した。即ち、上述の懸濁液にソニック処理(20キロサイクル、300秒)を行ない、抽出した。

この抽出液はトランスグルタミナーゼ活性を示した(第6図)。尚、コントロールとして、プラスミドpKK233-2 で形質転換したエシェリヒア・コリJM103 株より同様の方法で抽出した抽出液を用いた。

第 6 図より分るようにMTGaseはCa**依存性酵素であるので、Ca**が存在しないと、たとえ PERM P-10008の抽出液であってもトランスグルタミナーゼ活性は示さない。

尚、トランスグルタミナーゼ活性の測定は以下 の方法で行った。 リJM 103株 (FERM P-10008) を 5 0 μg/ml アンピシリンを含む 2 Y T 培地 (1.6 % バクトト リプトン、1.0 %酵母エキス、1.0 % NaC l, pH 6.7) 1.0 l 中で 3 7 c, 1 2 時間培養した。

その後、誘導剤として、イソプロピルチオガラクトシド(IPTG) 0.2 m & 添加して 5 時間培養した。培養菌体を違心分離により集菌し、0.15 M KC & 2 m M EDTA, 0.2 m M DTTを含む 2 0 m M トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後、同じ緩衝液 3 0 m & に懸濁した。

この集園関体の一部をとり、1% SDSで溶菌し、その抽出液の1部を SDSーポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。コントロールとして、モルモット肝より精製したMTGase標品及びプラスミドPKK233-2 で形質転換されたエシェリヒア・コリJM103 株を用いた。

この電気泳動したアクリルアミドゲルをニトロセルロース膜に写しとり、抗MTGase抗体で反応させた後にパーオキシダーゼを結合した2次抗体と反応させた。このウェスタンプロッティングの結

5 mg/ m ℓ アセチルα s₁ - カゼイン. 0.13mM (3 H) プトレシン, 5 0 mMトリスー塩酸 (pH7.5), 5 mM CaC ℓ s, 1 0 mM DTTおよび抽出液を含む反応液 (1 5 0 μ ℓ) を 3 7 ででインキュベートし一定時間ごとに一定量の反応液 (2 0 μ ℓ) を ベーパーディスク上でスポットする。未反応の (3 H) プトレシンをトリクロール酢酸で洗浄した後に、ペーパーディスク上に固着したアセチルα s₁ - カゼインに取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで測定した。

(L. Lorand et al.: Anal. Biochem., <u>50</u>, 623 - 631 (1972)) に基本的にしたがっている。
 (実施例 3 モノクロナール抗体カラムによるリコンピナントMTGaseの精製)

実施例 2 ii) で得た抽出液 3 0 m l を抗MTGase モノクロナール抗体カラム (1.4 cm × 6 cm) にアプライした。

TBS バッファー(20mMトリス-塩酸(pH 7.5)、 0.15 M KC &、 0.2 mM DTT, 2 mM EDTA)100 m & で洗浄した後、溶出バッファー(20 mM NaHCO。

特開平1-300889(6)

- NaOH (pH 1 0. 4) . 0. 4 mM DTT. 2 mM EDTA . 2M KC l) 4 0 ml で目的とするリコンピナント MTGaseを溶出した。

溶出液を20mlのカウンターバッファー(1M トリスー塩酸 (pH7.5, 0.4 mM DTT, 2 mM EDTA) で中和した。

その後、限外沪過処理を行うことにより、精製 リコンピナントMTGaseを得た。

確認の為に SDS-PAGEを行ったところ均一なバ ンドが得られた。この単離したリコンピナント MTGaseのトランスグルクミナーゼ活性を測定する と、その比活性は1690ユニット/mg×104 であっ た。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、MTGase CDNA の翻訳領域及び、各遺 伝子領域を含むクローンを示す。

第2図はMTGaseのアミノ酸配列及びMTGaseをコ ードするDNA 配列を示す。

第3図はブラスミドpLTG1621Bの構築図を示す。 第4図はプラスミドpKTG1の構築図を示す。

第5図はプラスミドpKTG1により形質転換させ たエシェリヒア・コリJM103 株(FERM P-10008) のウェスタンプロッティングを示す。

第6図は培養した FERM P-10008 抽出液のト ランスグルタミナーゼ活性を示す。

cDNA 5' AUDITORIO PLTG 20 www.pLTG4 pLTG 16 CHILD THE COLUMN TO THE COLUMN THE COLUMN TO THE COLUMN TO THE COLUMN THE COL pLTG31 pLTG 21 Okb

第 | 図

2

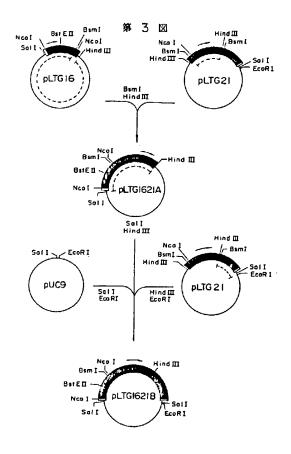
3

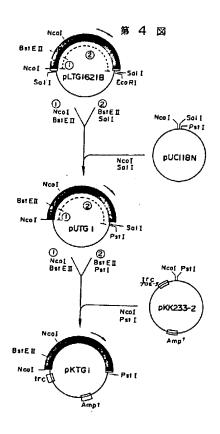
第 2 図

ATE CLA CHE CAT CHE ATE CHE CHE ABA TET ERT THE CHE CHE CHE cte ele the clarele ele che ele the the ete ale ete ele the وأو ولاد وأم ولاد ماد وله ولام ولم ولو ولاء ولم ولد ولد ماد وال 75 con the tên eta tên aêt aêt ata ais ais ais ais ais tên tên gêg the ole are the che che ale ale ale at the the che che age ace cha ett che etc etc att ele ete the che etc ate etg occ the att ear the che che the ate the eta che che the ate ete ete ale alt ett ete ete ete ete elt ett ete tilt aff che tèn ele cha she ele che che tit ete ete ale cha che gég 165 The ate the edg ede the ede and the ate and ede ata elt 186 ARC THE ERE CAR THE CHA ERE CHE ATE CHE ARE THE CHE ATE ete the ele ade and ede ale the ete ale ant edt ede ella gig 1200 the the ele ele ale ala elt ete the ete ele ele ete ete afg 225 che alle ete alle rée air elle ellr elle ete ete etr elle eéa gég the eac and and the act eat eat etc ate eac etc ate the the tec 255 ale ate ete ete ete ete ete ate ata ete tat ete tec gig 270 che ete alle the ele che the the ete the ett ett ete ete gig ALA CTC CTC CEC TEC CTT CEC ATC CEC ATC CEA CTC CTC ATC ATC ATC

767 180 184 680 680 680 680 180 480 480 680 680 480 680 189 ale con vic ore tot ore ore vic ore ore or vic vie vic ore or vice or ate the and the che that the ete est est ete ete ett elle fig 350 ALA CEC CRG CRG ALG AET CRA CEC ALA TIC TEC TET CEC CEA₁₅53 375 ceo ett ela ele ale ale ele ele ele ete ale ete ale ete ale tat₁₂₃₈ ota cer the ete the est esse ete ant est esse ete esse sale issue 405 ate ele ele alla elt ele tès ete ele ale tès ate alle ell 1128 420 cts cts ces cts als ate ats ats ate ats sto ces ces elt elt, elg 475 CEA GE GE ATC ATC GE GE THE ATC THE GEA GEG GEA TET GEA eke eke ele eka elt titt ett ale ele ake eke eta akt aka eke 465 cec ala alic cha che cer che che cha ale cea che cec afe_{a seg} ATC CET CTC CEC CEC AEC ATC ATC AET ATC CEC AET CEC TTT CEC AEC the ele the ale ale alt ele alt elt ele ale ele ela tec, ela eto eto eto ret ela elle ale ete ade rale alt ella ete ete gegg 525 ce cte ete ese ase ase ase ese ete ete ase ete ase ete est est est sea the the also also ate else etc etc ate etc the else also the 555 cet che the ete aet che te and ete ate ate ete cea cee ete 570 ctr ate che cha che che ane and the tha the che che and 1825 ses att the ete ale alt che ale ate ale ate ete ete ete ete ele alle ces are the are the are the att the eff the test the are the are the are

特開平1-300889(8)





第 6 図

